



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE PER LO SVILUPPO PRODUTTIVO E LA COMPETITIVITA'
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

N° 292410

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

num. domanda	anno	U.P.I.C.A.	data pres. domanda	classifica
001490	97	MILANO	24 06 1997	A61M

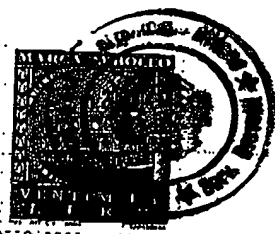
TITOLARE BERETTA ROBERTO
A MILANO

RAPPR. TE PIZZOLI PASQUALE

INDIRIZZO SOCIETA' ITALIANA BREVETTI SPA
VIA CARDUCCI 8
20123 MILANO

TITOLO CONTENITORE DI PRONTO IMPIEGO PER OTTENERE
COLLA DI FIBRINA AUTOLOGA

INVENTORE BERETTA ROBERTO
LODI SERGIO



BEST AVAILABLE COPY

Roma, 8 FEBBRAIO 1999

IL FUNZIONARIO REGGENTE
F.to ING. GIORGIO ROMANI

PER COPIA CONFORME DELL'ORIGINALE

Consegnato il

08 MAR 1999

Il Direttore UPICA

Romani

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI97A 001490

REG. A

DATA DI DEPOSITO 24/06/1997

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

D. TITOLO

"CONTENITORE DI PRONTO IMPIEGO PER OTTENERE COLLA DI FIBRINA AUTOLOGICA"

L. RIASSUNTO

Contenitore di pronto impiego per preparare colla di fibrina autologa comprendente cloruro di calcio come starter di coagulazione ed eventualmente acido tranexamico od acido epsilon-amino-caproico come stabilizzante della fibrina.

M. DISEGNO

- 2 -

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"CONTENITORE DI PRONTO IMPIEGO PER OTTENERE COLLA DI FIBRINA AUTOLOGA"

a nome del Signor Roberto BERETTA, di nazionalità italiana e residente in MILANO.

La presente invenzione riguarda un contenitore per la preparazione di colla di fibrina autologa, ed in particolare un contenitore di pronto impiego provvisto di un adatto starter da utilizzare per ottenere colla di fibrina autologa.

È noto che la colla di fibrina autologa è un emoderivato che trova largo impiego quale adesivo topico chirurgico o come agente emostatico. Esistono in commercio confezioni che contengono fibrinogeno concentrato proveniente da donatore, il quale è associato ad uno starter proteico di origine umana od animale come la trombina o batroxobina, per ottenere colla di fibrina eterologa.

Tali confezioni note implicano l'uso di materiale di origine umana o animale che, a causa della sua origine, può presentare problemi di possibile contaminazione di tipo virale con seri rischi per il ricevente della colla di fibrina. In passato si sono già verificati casi in cui gli organi tutelari sono stati a più riprese indotti alla sospensione della commercializzazione o addirittura al bando degli emoderivati ottenuti impiegando materiale di origine umana o animale. Sono noti inoltre in letteratura casi di rigetto che hanno accompagnato i reimpianti della fibrina originata con l'impiego di proteine umane o animali nei pazienti. Tali casi sono indotti proprio dall'origine

- 3 -

estranea all'organismo del ricevente della proteina sigillante che si andava a reimpiantare o di alcuni componenti utilizzati per la sua preparazione.

La colla di fibrina autologa, cioè ottenuta dal sangue dello stesso paziente, offre maggiore garanzia contro rischi di rigetto e/o di infezioni. Sono già stati descritti vari procedimenti per ottenere in modo estemporaneo colla di fibrina autologa, ma non esistono attualmente in commercio anche confezioni pronte per l'uso.

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire un contenitore di pronto impiego il quale consenta di ottenere colla di fibrina autologa, ed in particolare non dia luogo ad infezioni virali oppure a fenomeni di rigetto quando viene impiegato in chirurgia.

Tale scopo viene conseguito con un contenitore contenente uno starter del processo coagulativo che non è di origine umana o animale, bensì è una sostanza inorganica di sintesi che quindi non può essere infetta e che non dà luogo a rigetto essendo un composto inorganico.

Le caratteristiche del contenitore di pronto impiego secondo la presente invenzione sono specificate nella rivendicazione 1.

Il contenitore di pronto impiego secondo la presente invenzione presenta il notevole vantaggio di consentire la produzione di colla di fibrina autologa che può essere impiegata senza rischi di infezioni virali o fenomeni di rigetto. Un altro vantaggio del contenitore di pronto impiego secondo la presente invenzione è quello di consentire l'ottenimento di colla di fibrina autologa a costi proporzionalmente ridotti rispetto alle confezioni note.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi del contenitore formante oggetto della presente invenzione risulteranno evidenti agli esperti del ramo dalla

- 4 -

seguinte dettagliata descrizione di una sua forma realizzativa con riferimento ai seguenti esempi operativi.

ESEMPIO 1

Si prese un contenitore di vetro per antibiotici tappabile sotto vuoto da 5 ml in vetro trasparente bianco inerte spesso 1 mm e vi si introdussero 100 mg di acido tranexamico che agisce da stabilizzante della fibrina. L'acido tranexamico sintetico con purezza superiore al 98% è messo in commercio dalla ditta statunitense Sigma Inc. A parte si preparò una soluzione 1M di CaCl_2 pesando con bilancia di precisione 147,0 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (purezza > 99%) della stessa ditta statunitense Sigma Inc. Questo sale venne disciolto in 1 litro esatto di acqua distillata ultrapura apirogena, in pochi minuti a temperatura ambiente agitando frequentemente la miscela. Mediante un dispensatore di precisione a stantuffo, con precisione di dispensazione $\pm 5\%$ (tipo Eppendorf) si introdussero nel contenitore di vetro 80 μl della soluzione starter. In questa fase, contemporaneamente alla dispensazione, venne eseguita una filtrazione con filtro Millipore da 0,22 μm sterilizzatore, avendo particolare cura di evitare possibili contaminazioni da polveri o filamenti di qualsiasi genere. Al termine si procedette alla tappatura del contenitore di vetro con un tappo di gomma forabile e tappabile sotto vuoto avendo l'accortezza di nonappare completamente il contenitore in modo da permettere la tappatura successiva sotto vuoto ed eventualmente la successiva sterilizzazione con l'impiego di gas. Il contenitore venne quindi introdotto in un apposito dispositivo per la tappatura sotto vuoto avendo cura di evitare qualsiasi contaminazione da particelle solide presenti in atmosfera (filtrazione HEPA o ULPA in camera bianca). All'atmosfera interna del dispositivo venne

- 5 -

applicato, tramite una pompa da vuoto a membrana ed un regolatore micrometrico, un vuoto pari a 4 ml. Il controllo del livello di vuoto nell'atmosfera interna venne effettuato con l'impiego di un vacuometro di precisione (tolleranza ± 1 mbar). A questo punto, senza sfiatare il dispositivo, si procedette alla tappatura sotto vuoto del contenitore che venne recuperato per essere utilizzato come verrà descritto nell'Esempio che segue.

ESEMPIO 2

Si prelevarono 10 ml di sangue venoso da un paziente seguendo le raccomandazioni degli standard qualitativi per le analisi di laboratorio, per esempio con l'utilizzo di provette sterili sotto vuoto Vacutainer, additivate con una soluzione di citrato sodico 0,106 M. Particolare cura venne tenuta al mantenimento della sterilità del campione in fase di prelievo. Al termine del prelievo si agitò dolcemente la provetta per miscelare bene i componenti assicurando quindi l'azione anticoagulante del citrato sodico. La provetta venne quindi inserita in un'apposita centrifuga avendo cura di bilanciare il peso del rotore per evitare guasti della centrifuga stessa. Dopo aver chiuso il coperchio si procedette alla centrifugazione del campione a 3500 rpm per 15 minuti ottenendo la separazione dei globuli rossi (più densi) dal plasma citratato (sopranatante). La resa di plasma, che dipende prevalentemente dalle caratteristiche del sangue del donatore, in quel caso fu del 55%. La provetta contenente il plasma separato venne mantenuta tappata in condizioni sterili e depositata verticalmente in uno stativo per procedere al recupero del plasma. In questa fase si ebbe l'accortezza di non agitare in alcun modo la provetta onde evitare il rimescolamento delle due fasi separate nella centrifugazione. Si procedette quindi alla sterilizzazione della parte esterna del tappo della

- 6 -

provetta con alcool denaturato e successivamente si introdusse un ago sterile collegato ad una siringa sterile nel tappo della provetta. Si portò la punta dell'ago a 3-4 mm dal menisco di separazione delle due fasi e si prelevarono 4 ml di plasma. Usando lo stesso ago si forò il tappo del contenitore secondo la presente invenzione preparato come descritto nell'Esempio 1, dopo averne preventivamente sterilizzato il suo tappo con alcool. Non appena l'ago forò il tappo, il plasma citratato contenuto nella siringa venne risucchiato completamente nel contenitore. Questo venne agitato dolcemente e dopo circa 2 minuti a 37° si ottenne un coagulo di colla di fibrina autologa sterile già pronta per l'impiego immediato.

Come contenitore di vetro da impiegare nella realizzazione della presente invenzione in alternativa al contenitore per antibiotici descritto nell'Esempio 1, possono essere impiegate anche provette di vetro o di plastica da 5 a 15 ml di volume aventi diametro compreso tra 12 e 16 mm ed un'altezza compresa tra 75 e 100 ml. Lo spessore del contenitore dovrà essere idoneo a resistere alle sollecitazioni della differenza di pressione tra il suo interno e l'atmosfera quando viene evacuato. Tale spessore sarà di circa 0,7 mm per le provette a fondo emisferico o conico e di circa 1 mm per i contenitori a fondo piatto. I contenitori in plastica saranno preferibilmente di resina acrilica trasparente con spessore da 0,2 a 0,8 mm in modo da assicurare la tenuta del vuoto per almeno 12 mesi dopo la produzione. Le provette in plastica, dopo la preparazione, vengono eventualmente inserite in un contenitore ermetico sotto vuoto di stagnola con strato interno in polietilene sigillato a caldo, per garantire una tenuta perfetta sino alla data dell'utilizzo.

Va tenuto presente che l'evaporazione dei contenitori o delle provette

- 7 -

è raccomandabile, ma non è indispensabile per la realizzazione della presente invenzione.

La chiusura dei contenitori o delle provette verrà effettuata con tappi forabili di gomma o silicone atti a garantire la perfetta tenuta del vuoto e consentire la possibilità di tappatura sotto vuoto dopo l'introduzione dei componenti chimici e prima del passaggio alla fase di sterilizzazione a vapore.

Dopo la tappatura i contenitori possono essere sottoposti alla sterilizzazione con vapore a 121° C per circa 30 minuti. È anche possibile effettuare la sterilizzazione utilizzando irradiazione con raggi gamma o beta.

Come stabilizzante della fibrina, al posto dell'acido tranexamico può essere impiegato acido epsilon-amino-caproico puro, cristallino. La sua quantità sarà di circa 1 g quando si impiega un contenitore da 25 ml di volume che serve per una quantità di 20 ml di plasma. Spesso l'impiego dello stabilizzante della fibrina può non essere necessario.

Il $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ può essere introdotto nel contenitore, oltre che in soluzione come descritto nell'Esempio 1, anche in forma solida. Per esempio, nel caso di un contenitore da 5 ml si introdurranno in esso 11,76 mg di cloruro di calcio diidrato utilizzando un dosatore di precisione (errore massimo: 1-2 mg) per evitare l'inserimento di componenti estranei inquinanti.

Nel caso di contenitore da 15 ml di volume per una quantità di 12 ml di plasma, il cloruro di calcio diidrato solido da inserire ammonterà a 35,28 mg, mentre la quantità di acido tranexamico sarà proporzionalmente di circa 300 mg di cristallo.

Se il contenitore è da 25 ml di volume per una quantità di 20 ml di plasma, il cloruro di calcio diidrato da inserire sarà di 58,8 mg mentre la

- 8 -

quantità di acido tranexamico sarà proporzionalmente di 500 mg di cristallo.

Oltre che nella forma diidrata usata negli esempi, il cloruro di calcio può essere anche in qualsiasi altra forma idonea reperibile sul mercato, per esempio come $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Altre varianti, aggiunte e modifiche possono essere apportate dagli esperti del ramo al contenitore secondo la presente invenzione restando nell'ambito dell'invenzione stessa.

- 9 -

RIVENDICAZIONI

1. Contenitore di pronto impiego per preparare colla di fibrina autologa comprendente uno starter di coagulazione, caratterizzato dal fatto di contenere come starter di coagulazione cloruro di calcio.
2. Contenitore secondo la precedente rivendicazione, caratterizzato dal fatto di contenere anche uno stabilizzante della fibrina.
3. Contenitore secondo la precedente rivendicazione, caratterizzato dal fatto che come stabilizzante della fibrina si usa acido tranexamico.
4. Contenitore secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che come stabilizzante della fibrina si impiega acido epsilon-amino-caproico.
5. Contenitore secondo una delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto di essere sotto vuoto.
6. Metodo per preparare colla di fibrina autologa mediante il contenitore secondo una delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto di prelevare il sangue da un paziente, separarne il plasma e portarlo a contatto con cloruro di calcio in ambiente sterile.

pp. Roberto BERETTA

Il mandatario _____

(Società Italiana Brevetti S.p.A.)

PVP/amp/MI/011457/IN

Translation of Italian Patent # 01292410

- 1 -

Issued to Roberto Beretta

"A CONTAINER READY TO USE FOR OBTAINING AUTOLOGOUS FIBRIN GLUE"

5 The present invention relates to a container for preparing autologous fibrin glue, and particularly to a container ready to use being provided with a starter suitable for obtaining autologous protein glue.

The autologous fibrin glue is known to be a haemoderivative largely used as a topical surgical adhesive or an haemostatic agent. Several packages are available on
10 the market containing concentrated fibrinogen from donors, associated to a proteic starter of human or animal origin, such as thrombin or batroxobin, for obtaining eterologous fibrin glue.

Such known packages involve the use of material of human or animal origin, which, owing to its origin, could result in possible viral contamination and in
15 serious risks for the receiver of the fibrin glue. In the past the authorities have been several times compelled to suspend from the trade or even ban the haemoderivatives obtained by using material of human or animal origin. Furthermore, rejection cases are known from the literature resulting from the reimplants of fibrin produced by using human or animal proteins for patients. Such
20 cases are indeed due to the eterologous origin, with respect to the receiver organism, of the sealant protein being reimplanted or some of the components used for preparing it.

The autologous fibrin glue, i.e. obtained from the blood of the patient himself, is more reliable with respect to the rejection and/or the infection risks. Several
25 procedures have already been described for obtaining extemporary autologous fibrin glue, but no "ready to use" package is by now available on the market.

The object of the present invention is therefore to provide a container ready to use, allowing to obtain autologous fibrin glue, and particularly, not resulting in viral infections or rejection cases when used in surgery.

30 Such an object is achieved by a container provided with a coagulation starter, being neither of human nor of animal origin, but a synthetic inorganic compound, which therefore cannot be infected and does not result in rejection.

The features of this "ready to use" container, according to the present invention, are specified in claim 1.

35 The container according to the present invention has the great advantage of allowing the production of autologous fibrin glue which may be used with no risk

BEST AVAILABLE COPY

- 2 -

of viral infections or rejection cases. Another advantage of the container ready to use according to the present invention is to allow the autologous fibrin glue to be obtained at costs proportionally lower with respect to the known packages.

Further features and advantages of the container according to the present invention will be evident to those skilled in the art from the following detailed description of an embodiment thereof with reference to the following practical examples.

EXAMPLE 1

100 mg of tranexamic acid, acting as fibrin stabilizer, were introduced in a 5 ml glass container for antibiotics, being plugable under vacuum, made of transparent white glass, inert and 1 mm thick. The synthetical tranexamic acid, which is more than 98% pure, is put on the market by the American company Sigma Inc. Separately, a 1M CaCl_2 solution was prepared, by weighing on a precision balance 147.0 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (>99% pure), from the same American company Sigma Inc. This salt was dissolved in exactly 1 liter of ultrapure aprotogenic distilled water, for a few minutes at room temperature, under frequent stirring. By using a precision piston dispenser, having a dispensing precision of $\pm 5\%$ (Eppendorf like), 80 μl of the starter solution were introduced in the glass container. In this step, at the same time as the dispensing, a filtering was carried out by using a 0.22 μm Millipore sterilizing filter, while carefully preventing possible contamination from powders or filaments of any kind. Finally the glass container was plugged with a rubber cap being pierceable and plugable under vacuum, while minding not to completely plug the container, so as to allow the subsequent vacuum plugging and possibly a further sterilization by using gas. The container was then introduced into a suitable device for vacuum plugging, while preventing any possible contamination from solid particles in the atmosphere (ULPA or HEPA filtration in sterile chamber). A vacuum as high as 4 ml was applied, by using a membrane vacuum pump and a micrometric control, to the inner atmosphere of the device. In order to control the vacuum level in the inner atmosphere, a precision vacuumometer was used (precision ± 1 mbar). Finally, without discharging the device, the container was plugged under vacuum, to be thereafter recovered for the use as described in the following Example.

EXAMPLE 2

10 ml of venous blood were drawn from a patient according to the provisions of the qualitative standards for clinical analysis, e.g. by using Vacutainer sterile test-tubes, added with a 0.106 M sodium citrate solution. The sample was carefully kept

- 3 -

sterile during the blood drawing. Finally, the sample was gently shaken for wholly mixing the components, thereby ensuring the anticoagulating action of sodium citrate. The test-tube was then introduced in a suitable centrifuge, while carefully balancing the rotor weight in order to prevent the same centrifuge to be damaged.

5 Once the lid is sealed, the sample was centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes, thereby separating the red cells (being thicker) from the citrated plasma (supernatant). In this case the plasma yield, mainly depending upon the characteristics of the donor blood, was as high as 55%. The test-tube containing the separated plasma was kept plugged in sterile conditions and was placed vertically in

10 a stand for recovering the plasma. In this step care was taken not to shake the test-tube, in order to prevent the mixing of the two phases separated in the centrifugation. The outer portion of the test-tube cap was then sterilized by using denatured alcohol and then a sterile needle, being connected to a sterile syringe, was introduced in the test-tube cap. The needle was brought up to 3-4 mm apart

15 from the separating meniscus of the two phases, and 4 ml of plasma were drawn. By using the same needle, the cap of the container according to the present invention, which had been prepared as described in Example 1, was pierced, having been previously sterilized by using alcohol. As soon as the needle pierced the cap, the citrated plasma contained in the syringe was completely sucked into the

20 container. This was gently shaken and, after about 2 minutes at 37°C, a clot of sterile autologous fibrin glue was obtained, ready to be immediately used.

As for the glass container to be used in the present invention, other than the glass container for antibiotics being described in Example 1, also glass or plastic test-tubes may be used, having a volume ranging from 5 to 15 ml, a diameter

25 ranging from 12 to 16 mm and a height ranging from 75 to 100 mm. The container should be suitably thick in order to withstand the stresses resulting from the pressure difference between its inner space and the atmosphere when evacuated. Hemispherical or conical bottom tubes will be 0.7 mm thick, flat bottom tubes 1 mm thick. The plastic containers will be preferably made of transparent acrylic

30 resin, 0.2-0.8 mm thick, in order to ensure the vacuum keeping for at least 12 months after production. The plastic test-tubes, after the preparation, are possibly introduced into a tin-foil vacuum air-tight container having a heat-sealed inner polyethylene layer, in order to ensure a perfect air-tightness until the date of use.

It should be noted that the vaporization of containers or test-tubes is

35 advisable, however not necessary for putting the present invention into practice.

- 4 -

The containers or test-tubes are plugged by rubber or silicon pierceable caps, being suitable to ensure the container to be perfectly air-tight and to allow the vacuum plugging after the introduction of the chemical components and before the steam sterilization step.

5 After the plugging, the containers may be sterilized under steam at 121°C for about 30 minutes. The sterilization may be carried out also by irradiation with gamma or beta rays.

10 As a fibrin stabilizer, also pure and crystalline epsilon-amino-caproic acid may be used instead of tranexamic acid. The amount will be about 1 g when using a 25 ml container, suitable for a plasma amount of 20 ml. Sometimes it is not necessary to use a stabilizer.

15 Also solid $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ may be used instead of a solution, as described in the Example 1. For example, 11.76 mg of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ will be introduced in a 5 ml container, by using a precision dosimeter (maximum error: 1-2 mg), in order to prevent polluting foreign components to be introduced.

In case of a 15 ml container for a plasma amount of 12 ml, the solid dihydrated calcium chloride amount to be introduced will be as high as 35.28 mg, while the tranexamic acid amount will proportionally be as high as 300 mg of crystals.

20 In case of a 25 ml container for a plasma amount of 20 ml, the dihydrated calcium chloride amount to be introduced will be as high as 58.8 mg, while the tranexamic acid amount will proportionally be as high as 500 mg of crystals.

Besides the dihydrated form used in the Examples, the calcium chloride may be in any other suitable form available on the market, e.g. as $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

25 Other changes, additions and modifications may be made by those skilled in the art to the container of the present invention, without departing from the scope of the same invention.

- 5 -

CLAIMS

1. A container ready to use for preparing autologous fibrin glue, comprising a coagulation starter, characterized in that it comprises calcium chloride
5 as coagulation starter.
2. A container according to the previous claim, characterized in that it further comprises a fibrin stabilizer.
3. A container according to the previous claim, characterized in that tranexamic acid is used as fibrin stabilizer.
- 10 4. A container according to claim 2, characterized in that epsilon-amino-caproic acid is used as fibrin stabilizer.
5. A container according to any of the previous claims, characterized in that it is under vacuum.
- 15 6. A method for preparing autologous fibrin glue by means of the container according to any of the previous claims, characterized in that it comprises drawing the blood from a patient, separating the blood and contacting it with calcium chloride under a sterile atmosphere.

- 6 -

"A CONTAINER READY TO USE FOR OBTAINING AUTOLOGOUS FIBRIN GLUE"

ABSTRACT

- 5 A container ready to use for preparing autologous fibrin glue comprising calcium chloride as coagulation starter and, possibly, tranexamic acid or epsilon-amino-caproic acid as fibrin stabilizer.

**WRITTEN OPINION
SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/IT98/00173

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 96 273 97
- D2: WO 96 178 71
- D3: EP 0 592 242
- D4: Arch Otorhinolaryngol (1983) 237, pp. 279-283.
- D5: US 5 030 215
- D6: WO 94 225 03

Section V

V.1. Novelty

Objections under Article 33(2) PCT:

D1 discloses autologous glue sealants comprising anticoagulated plasma as the first component and calcium chloride as fibrinogen activator as the second component, (see D1, the abstract, page 8, line 16 - page 9, line 33 and page 23, line 34 - page 24, line 13 and pages 35-37, example 4 and claims 11 and 20-25). Thus, the subject matter of present claim 1 and 6 appears to lack novelty over D1.

D2 discloses plasma concentrates and autologous tissue sealant compositions comprising plasma as the first component and calcium as the second component, each component being contained in a syringe, (see D2, the abstract, page 25, line 16 - page 27, line 20, page 33, line 15 - page 35, line 5, page 50, lines 3-15 and figure 7). Thus, the subject matter of present claims 1 and 6 appears to lack novelty with respect to D2.

D3 discloses kit for preparing autologous fibrin glue comprising a composition containing a source of calcium, (see D3, page 4, lines 20-34, page 5, lines 1-4, page 6, lines 25-35, page 13, lines 47-55, page 15, lines 39-47 and claim 64). Thus, the subject matter of present claims 1 and 6 appears to lack novelty with respect to D3. Moreover, the prior art described in D3, page 2, lines 28-33 appears to anticipate the novelty of present claims 1-2 and 8.

D4 discloses two component systems for preparing an autologous fibrin glue comprising as the first component autologous blood plasma and as the second component a 40 mM calcium chloride solution. Component one furthermore contains

**WRITTEN OPINION
SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/IT98/00173

tranexamic acid as antifibrinolyticum, (see D4, page 280 - page 281, line 15). Thus, the subject matter of present claims 1 and 6 appears to lack novelty over D4.

V.2. Inventive step

Objections under Article 33(3) PCT:

It appears that the only differences between the present claims and the documents D1-D4 is that the calcium chloride according to present claim 1 is contained in a sealed container and that the container optionally is evacuated, (present claim 6). However, such features are not considered to be inventive, since the teaching in D1-D4 forms the technical basis for the kit. Thus, given the teaching that autologous anticoagulated serum may be contacted with calcium chloride in order to form glue, it is not inventive to claim a sealed and optionally evacuated container containing either one of those two components. The principle of evacuating vials and other containers which are to be filled with a fluid, (e.g. lyophilized drug intended for reconstitution), is well known to the skilled person, who is aware of the advantages that this principle offers; namely that the added fluid can easily be added without any danger of inducing a high pressure inside the sealed vial. Thus, this feature does not appear to add subject matter to the present claims, which would constitute inventive subject matter.

The presence of fibrin stabilisers according to present claims 2-4 can also not be regarded as inventive, since such stabilisers are also well known to the skilled man as constituents of two component fibrin sealants, as also supported by D4, (see D4, page 280, lines 6-8 from bottom), D5, (see D5, col. 4, lines 42-63) and D6, (see D6, the abstract and page 7, second paragraph).

Thus novel subject matter falling within the scope of present claims 1-6 appears to lack an inventive step.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.